

Universitäts-Kinderspital Zürich

Abteilung für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Grotzer

Betreuung der Masterarbeit: Dr. sc. nat. Stefano Vavassori

Leitung der Masterarbeit: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. Jana Pachlopnik Schmid

Recurrent inflammatory disease caused by a heterozygous mutation in CD48

Mouse model of CD48 haploinsufficiency

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Medicine (M Med)

der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Emanuel Gossweiler (13-918-750)

2019

Inhaltsverzeichnis

<u>1. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>3</u>
<u>2. BEGLEITTEXT</u>	<u>4</u>
2.1. EINLEITUNG	4
2.2. MATERIAL UND METHODEN	6
2.2.1. STUDIENDESIGN UND VERSUCHSTIERE	6
2.2.2. LABORMETHODEN.....	7
2.2.3. HISTOLOGIE	7
2.2.4. GRAFIKEN UND STATISTIK.....	7
2.2.5. TIERVERSUCHSBEWILLIGUNG.....	8
2.3. RESULTATE	8
2.3.1. KLINIK UND LABORBEFUNDE	8
2.3.2. HISTOLOGIE	10
2.4. DISKUSSION	12
2.5. EIGENLEISTUNG.....	13
2.6. LITERATURVERZEICHNIS	14
<u>3. PUBLIKATION</u>	<u>15</u>
<u>4. LEBENSLAUF.....</u>	<u>46</u>
<u>5. ERKLÄRUNG</u>	<u>47</u>

1. Zusammenfassung

Einleitung, Fragestellung: Der Oberflächenrezeptor CD48 gehört zu der Familie der Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) und ist über die Interaktion mit dem ebenfalls zur SLAM-Familie gehörenden Rezeptor CD244 (2B4) an der Regulierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen beteiligt. Bei einem Patienten kam es seit dem Alter von neun Monaten zu wiederholten Episoden mit Fieber und Exanthemen, begleitet von Splenomegalie, Panzytopenien, Hyperferritinämie, Interleukin-6 (IL-6) Hyperzytokinämie sowie Zeichen von Hämophagozytose im Knochenmark. Nach Ausschluss einer primären oder sekundären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) und einer genetisch bedingten autoinflammatorischen Erkrankung wurde mittels Whole Exome Sequencing eine de novo aufgetretene, heterozygote Mutation in CD48 des Patienten entdeckt. Die Zellen des Patienten zeigten infolge der Mutation eine reduzierte CD48 Expression an der Zelloberfläche und eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Die NK-Zellen entwickelten zudem Defekte in der Reifung zu effektiveren zytotoxischen Zellen. Das Ziel des Mausexperimentes war herauszufinden, ob es bei Mäusen mit Mutation in CD48 zur Ausbildung eines vergleichbaren Phänotyps nach Infektion mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) kommt. Weiter wurde untersucht, ob die Mäuse die diagnostischen Kriterien einer HLH erfüllen.

Methoden: Mäuse des Stammes C57BL/6 mit den Genotypen CD48^{+/+} (WT), CD48^{+/-}, CD48^{-/-} und *Prf1*^{-/-} wurden mit LCMV infiziert. Während zwei Wochen wurde regelmässig das Gewicht und die Temperatur gemessen sowie der Aktivitäts- und Allgemeinzustand der Mäuse beurteilt. Nach tierschutzgerechter Euthanasie erfolgte die Entnahme von Blut zur Analyse diverser Laborwerte, weiter die Entnahme der Leber und Milz, wobei von der Leber Schnittpräparate angefertigt und auf Hämophagozytose-Zeichen untersucht wurden.

Resultate: Im Gegensatz zu den WT Mäusen entwickelten die CD48^{+/+} und CD48^{-/-} Mäuse eine Hyperferritinämie nach LCMV Infektion; auch zeigten CD48^{-/-} Mäuse signifikant höhere IL-6 Werte als die WT Mäuse. Bei allen Mausstämmen waren nach LCMV-Infektion Zeichen der Hämophagozytose in der Leber zu beobachten; in den CD48^{+/+} und CD48^{-/-} Mäusen war die Anzahl Makrophagen mit Hämophagozytose höher als bei den WT Mäusen, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war. Weder CD48^{+/+} noch CD48^{-/-} Mäuse entwickelten jedoch das Vollbild der HLH nach LCMV-Infektion.

Schlussfolgerungen: Sowohl CD48^{+/+} als auch CD48^{-/-} Mäuse entwickeln eine überschießende Entzündungsreaktion nach LCMV-Infektion. Die Befunde im Mausexperiment wieder spiegeln die beim Patienten mit Mutation in CD48 beobachteten Laborbefunde und unterstützen die Annahme, dass eine ausreichende Expression von CD48 essentiell ist für die Limitation einer Entzündungsreaktion.

2. Begleittext

2.1. Einleitung

CD48 (SLAMF2, BLAST-1) ist ein über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbundener Oberflächenrezeptor und gehört zu der Familie der Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) Rezeptoren, welche eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen (1). CD48 wird auf fast allen hämatopoetischen Zellen sowohl beim Menschen wie auch bei der Maus exprimiert (2). Mit hoher Affinität bindet CD48 den ebenfalls zu der SLAM-Familie gehörenden Rezeptor CD244 (SLAMF4, 2B4) (3). CD244, ein Transmembranprotein, interagiert mit dem intrazellulären Anteil mit Signalmolekülen wie dem SLAM-assoziierten Protein (SAP) und dem Ewing sarcoma associated transcript-2 (EAT-2). Die Aktivierung des CD244 Signalweges über SAP reguliert die Aktivierung, Expansion und Reifung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen (2, 4, 5). In Mausexperimenten konnten sowohl aktivierende wie inhibierende Effekte der Interaktion zwischen CD48 und CD244 gezeigt werden (6). Die Dichte der Oberflächenexpression von CD48 und CD244 sowie das Vorhandensein von SAP könnten mögliche Faktoren sein, die beeinflussen, ob es zu einem inhibierenden oder aktivierenden Effekt kommt (2, 5, 6).

Bei einem Patienten im Kinderspital Zürich wurde eine heterozygote Mutation in CD48 gefunden. Dieser Patient leidet seit seiner frühen Kindheit unter wiederholten Episoden mit Fieber und Exanthemen, begleitet von Splenomegalie, Panzytopenien, Hyperferritinämie, Hyperzytokinämie sowie Zeichen von phagozytierten Blutzellen (Hämophagozytose) im Knochenmark. Es wurde angenommen, dass die de novo aufgetretene Mutation ursächlich für diesen hyperinflammatorischen Phänotypen ist.

Bei den Untersuchungen der Zellen des Patienten wurde eine reduzierte CD48 Oberflächenexpression nachgewiesen (siehe Publikation Abbildung 1F). Die Zellen des Patienten zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (siehe Publikation Abbildung 1H). Die NK-Zellen entwickelten zudem Defekte in der Reifung zu effektiveren zytotoxischen Zellen (siehe Publikation Abbildung 2B, 2D und im Anhang Abbildung E6). Formell erfüllte der Patient sechs von acht klinischen Kriterien der Hämophagozytischen Lymphhistiozytose (HLH, siehe Anhang Publikation Abbildung Tabelle E3). Die HLH ist eine seltene, potentiell lebensbedrohliche Erkrankung des Immunsystems, welche durch eine unkontrollierte Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen charakterisiert ist (7). Klinisch ist die Erkrankung unter anderem durch Fieber, Splenomegalie, Zytopenie und Hämophagozytose im Gewebe (z.B. Knochenmark) gekennzeichnet (8).

Es wird zwischen primären Formen (siehe Tabelle 1), welche genetisch bedingt sind, sowie sekundären Formen, die mit Infektionen, malignen oder autoinflammatorischen/ autoimmunen Erkrankungen assoziiert sind, unterschieden (7).

Tabelle 1*: Primäre Formen von HLH

Subtyp	Gen	Protein	Funktion	Mausmodell
<i>Ohne Hypopigmentation - Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose (FHL)</i>				
FHL-1	Nicht bekannt	Nicht bekannt		
FHL-2	<i>PRF1</i>	Perforin	Porenbildung	<i>Prf1^{-/-}</i>
FHL-3	<i>UNC13D</i>	Munc 13.4	Vesikel-Priming	<i>Unc13d^{jinx/jinx}</i>
FHL-4	<i>STX11</i>	Syntaxin 11	Vesikelfusion	<i>Stx11^{-/-}</i>
FHL-5	<i>STXBP2</i> (<i>UNC18B</i>)	Munc 18.2	Vesikelfusion	
<i>Mit Hypopigmentation</i>				
Chédiak-Higashi Syndrom	<i>LYST</i>	Lyst	Vesikeltransport	<i>Lyst^{-/-} souris</i>
Griselli Syndrom Typ 2	<i>RAB27A</i>	Rab27a	Vesikeldocking	<i>Rab27^{-/-}</i>
Hermansky-Pudlak Typ 2	<i>AP3B1</i>	AP-3	Vesikeltransport	<i>Ap3b1^{-/-} pearl</i>
<i>Mit Epstein-Barr-Virus (EBV)- assoziierte HLH</i>				
XLP-1	<i>SH2D1A</i>	SAP	Signaltransduktion in T- und NK- Zellen	<i>Sh2d1a^{-/-}</i>
XLP-2/XIAP-Defizienz	<i>XIAP/ BIRC4</i>	XIAP	Apoptose-Inhibition	<i>Birc4^{-/-}</i>
CD27-Defizienz	<i>CD27</i>	CD27	Lymphozyten-costimulierendes Molekül (9)	
FAAP24-Defizienz	<i>FAAP24</i>	FAAP24	DNA-Reparatur (10)	

XLP: X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung, XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein,

FAAP: Fanconi Anemia Core Complex-Associated Protein

*Adaptiert nach der 2017 IUIS Klassifikation für primäre Immundefekte (11) und E. Brisse et al. (12)

Die bekannten genetischen Mutationen führen zu einem Defekt der Zytotoxizität. Mutationen können das Perforin-Gen selber oder andere Gene, deren Proteine, wie z.B. Munc13.4 oder Syntaxin 11, eine Rolle in der Ausschüttung der zytotoxischen Granula spielen, betreffen (7). Perforin führt zu der Bildung einer Pore an der Zellmembran der Zielzelle, die Freisetzung von Granzymen in der Ziellzelle führt schlussendlich den Zelltod herbei (13). NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen mit einem Zytotoxizitätsdefekt können Zielzellen nicht oder ungenügend entfernen, was zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Aktivierung von NK- und T-Zellen führt (13). Die aktivierten Immunzellen setzen grosse Mengen an Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-10 sowie IL-18 frei (7). Die durch die Zytokine ebenfalls aktivierten Makrophagen führen zur Hämophagozytose sowie Gewebe- und Organschäden (13). Bei dem Patienten war die IL-6 Hyperzytokinämie ausgeprägter als die IFN- γ Hyperzytokinämie (siehe Publikation Abbildung 1B), die bei familiären Formen typischerweise im Vordergrund steht (7).

Beim Patienten wurden mittels genetischer Testung, Proteinexpressionstestung und funktionellen Assays bekannte hereditäre Formen der HLH ausgeschlossen. Bei normaler Perforin-expression und normaler Degranulation von NK-Zellen nach Stimulation mit K562-Zielzellen (siehe Anhang Publikation Abbildung E2) sowie unauffälliger genetischer Untersuchung der verschiedenen mit HLH assoziierten Gene fanden sich keine Hinweise für diese Erkrankung. Es wurde einzig eine heterozygote Mutation im *STX11* Gen gefunden. Diese Mutation wurde nicht als primäre Ursache des hyperinflammatorischen Phänotyps des Patienten angesehen,

weil dieselbe Mutation auch beim gesunden Vater nachweisbar war, keine weitere *STX11* Mutation beim Patienten gefunden wurde und kein funktioneller Defekt nachweisbar war (normale Degranulation von NK-Zellen). Der lösliche CD25 Rezeptor (sCD25) war nicht ausreichend erhöht, um als Diagnosekriterium gelten zu können (siehe Publikation Abbildung 1A). Autoinflammatorische und autoimmune Erkrankungen wurden ebenso ausgeschlossen (siehe Anhang Publikation Abbildung Tabelle E3). Ein bestimmter infektiöser Trigger, insbesondere der Epstein-Barr-Virus, konnte nicht infiziert werden. Es fanden sich keine Hinweise auf eine maligne Grunderkrankung beim Patienten.

Um die Annahme zu unterstützen, dass die Mutation in CD48 im Patienten ursächlich für die Symptomatik ist, wurde ein Mausexperiment initiiert mit der Fragestellung, ob Mäuse mit Mutationen in CD48, welche mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) infiziert werden, einen vergleichbaren Phänotyp entwickeln wie der Patient. Parallel dazu wurden Mäuse mit fehlenden Kopien des Perforin-Gens (*Prf1*^{-/-}, Perforin-knockout, PKO) mit der gleichen Anzahl infektiöser Virionen (Plaque Forming Unit, PFU) des LCMV infiziert (im Sinne einer Positivkontrolle). PKO Mäuse entwickeln nach Infektion mit dem LCMV einen HLH-ähnlichen Phänotyp (14). Es wurde untersucht, ob die CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäuse einen solchen HLH-ähnlichen Phänotyp entwickeln.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Studiendesign und Versuchstiere

Für das Experiment wurden sechs bis acht Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6 mit den Genotypen CD48^{+/+} (Wildtyp, WT), CD48^{+/-}, CD48^{-/-} sowie *Prf1*^{-/-} (PKO) verwendet, die in einer tiergerechten und pathogenfreien Umgebung in einem Biosafety-Labor Stufe 2 gehalten wurden. Heterozygote (CD48^{+/-}) Mäuse wurden durch Kreuzung von CD48^{-/-} und WT Mäusen gezüchtet, die Genotypisierung erfolgte mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mäuse jedes Genotyps wurden am Tag 0 eine unterschiedliche Anzahl PFU des LCMV intraperitoneal injiziert. Jeden zweiten bis dritten Tag erfolgte die Messung der Körpertemperatur mittels eines rektalen Thermometers, die Messung des Gewichts und die Beurteilung des Aktivitäts- und Allgemeinzustandes mittels eines definierten Punkteschemas (siehe Tabelle 1). Am Tag 11 oder 12 wurden die Tiere tierschutzgerecht mit CO₂ euthanasiert, anschliessend wurde Blut durch Herzpunktion entnommen sowie die Leber und Milz entfernt, gewogen und für weiterführende histologische Untersuchungen konserviert. Nicht-infizierte Mäuse wurden ebenfalls tierschutzgerecht mit CO₂ euthanasiert, es erfolgte ebenfalls die Entnahme von Blut sowie der Leber und Milz.

Tabelle 2: Punkteschema zur Beurteilung des Allgemein- und Aktivitätszustandes der infizierten Mäuse

Score sheet for LCMV infections of susceptible mice (WT, CD48 ^{+/+} , CD48 ^{-/-} and PKO)												
Mouse Details	ID:	Strain:			Gender:		Birthdate:					
Date												
Observation												
Weight [g]												
Temperature [°C]												
Activity score												
Weight score												
Temperature score												
Total score												
Comments												

Observation score total of:

- Activity: 2 spontaneous activity reduced – 5 spontaneous activity reduced, locomotion after slight stimulus - 10 no spontaneous activity, locomotion after stimulus – 20 immobile, no locomotion after moderate stimulus
- Posture: 2 hunched – 10 head on the cage floor – 20 Lying prone on cage floor
- Eyes: 2 squinted or closed – 5 discharge

Weight score: 1 point for each -3% deviation from the original weight

Temperature score: 1 point for each 0.5°C deviation from 38°C

Total score ≥ 10: mandatory daily monitoring.

Total score ≥ 20: euthanize.

Additional criteria for immediate euthanization:

- 20 % weight loss
- A score above 10 for more than 5 days

2.2.2. Labormethoden

Das Differentialblutbild sowie die Messung des Ferritins wurde im Routine-Labor des Universitäts-Kinderspitals Zürich durchgeführt. Die immunophänotypischen Oberflächenmerkmale der Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Messung der Zytokine, des Fibrinogens sowie des Spiegels des löslichen CD25 wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

2.2.3. Histologie

Das entnommene Leber- und Milzgewebe wurden an die Firma Sophistolab gesendet, es erfolgte die Fixierung mittels Formalin und Einbettung in Paraffin. Von Mäusen jedes Genotyps wurden Schnitte des eingesendeten Lebergewebe angefertigt, die mittels Hämatoxylin-Eosin eingefärbt wurden. Die Makrophagen in der Leber (Kupffer-Zellen) wurden mittels dem Makrophagen-spezifischen Antikörper F4/80 speziell eingefärbt. Fotografien der Gewebeschnitte wurden mit dem Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop, der Axio MR R3 Kamera und der ZEN Pro 2012 Software aufgenommen.

2.2.4. Grafiken und Statistik

Zur Darstellung und Auswertung der erhobenen Daten wurde die Software Prism Version 8.2.0 für MacOS (Graphpad) verwendet.

2.2.5. Tierversuchsbewilligung

Das Veterinäramt des Kantons Zürich hat das Gesuch am 06.11.2017 bewilligt und der Studie die Nummer ZH047/17 vergeben.

2.3. Resultate

2.3.1. Klinik und Laborbefunde

In der ersten Infektionsrunde untersuchten wir, wie die Mäuse der verschiedenen Genotypen auf verschiedene Dosen PFU des LCMV ansprechen. Aufgrund des klinischen Verlaufes entschieden wir uns in den weiteren Infektionsrunden 2500 PFU LCMV zu verwenden. Nach Infektion zeigte sich bei den mit 2500 PFU LCMV infizierten Mäusen ab dem 7. Tag eine Gewichtsstagnation bzw. -abnahme (Abbildung 1A), eine Abnahme der Körpertemperatur (Abbildung 1B) sowie eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Am Tag 11 hatten die Mäuse aller Genotypen eine Splenomegalie (Abbildung 1C) entwickelt. Laboranalytisch fand sich am Tag 11 bei allen Genotypen im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen eine Abnahme der Hämoglobin-Konzentration (Abbildung 1D) sowie der Thrombozytenzahl (Abbildung 1E). Die CD48^{+/-}, CD48^{-/-} sowie die PKO Mäuse entwickelten eine Hyperferritinämie (siehe Tabelle 4 und Publikation Abbildung 1J). Bei der Analyse der Zytokine zeigten sich erhöhte IL-6 Werte bei den CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäusen (siehe Publikation Abbildung 1J), wobei nur die IL-6 Werte der CD48^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant erhöht waren. Die PKO Mäuse zeigten erhöhte IFN- γ Werte, während diese Werte bei den CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäusen nicht oder nur gering erhöht waren (Abbildung 1H). Weiter zeigten die CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu den PKO Mäusen keine erhöhte Konzentration des löslichen CD25 Rezeptor (siehe Publikation Abbildung 1J).

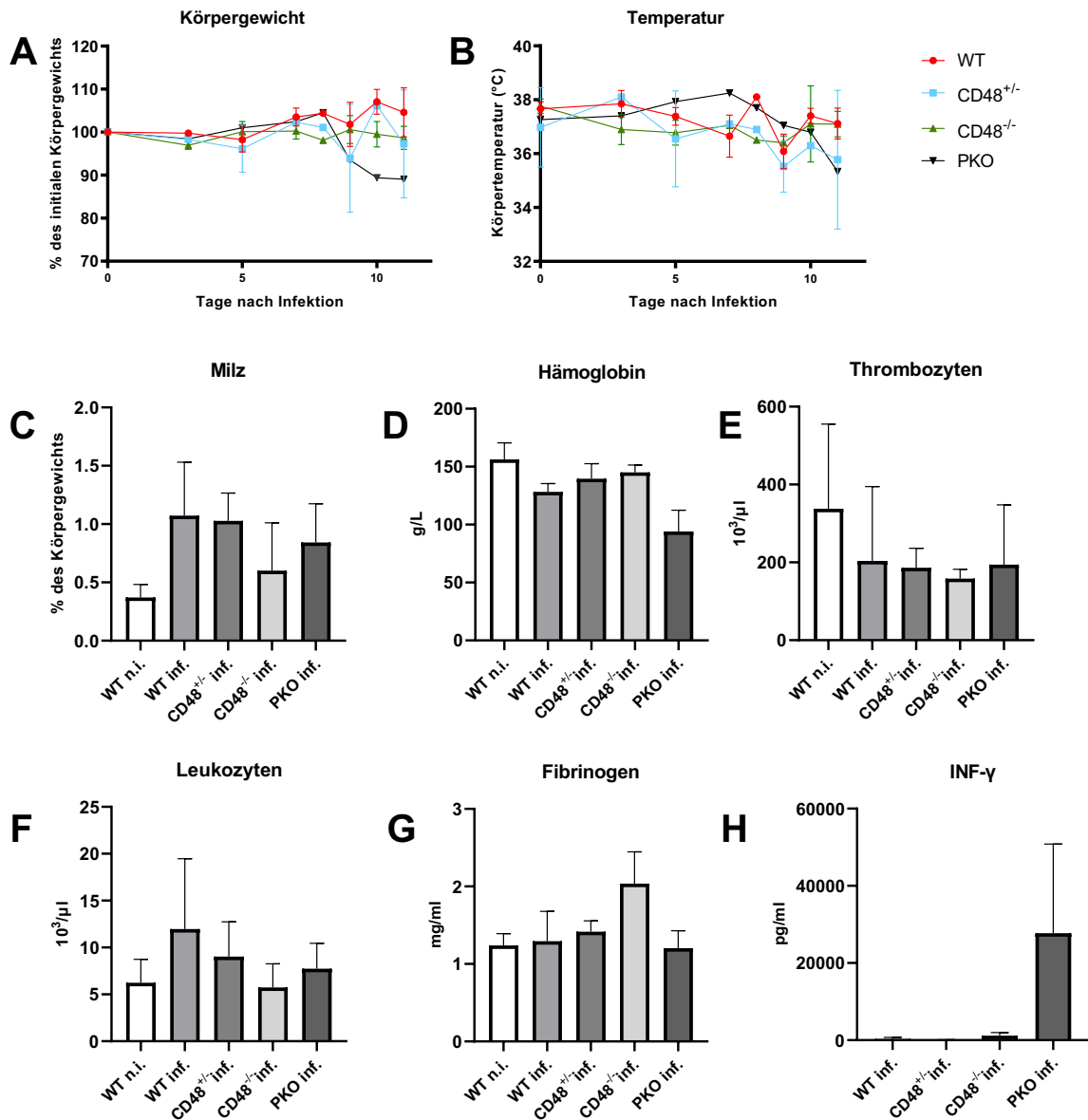


Abbildung 1: Verlauf von Körpergewicht und Temperatur sowie gemessene Laborwerte

n.i. = nicht infiziert, inf. = infiziert

(A) Körpergewicht und (B) Körpertemperatur nach Infektion mit 2500 PFU LCMV. (C) Milzgewicht, (D) Hämoglobin, (E) Thrombozyten, (F) Leukozyten, (G) Fibrinogen und (H) INF- γ 11 Tage nach Infektion mit 2500 PFU LCMV.

Für die Auswertung wurden 11 nicht infizierte WT, 5 infizierte WT, 4-5 infizierte CD48^{+/-}, 5 infizierte CD48^{-/-} sowie 3 infizierte PKO Mäuse berücksichtigt.

2.3.2. Histologie

Bei nicht-infizierten Mäusen zeigte sich in allen Genotypen ein ähnliches histologisches Bild in den Leberschnitten ohne das Vorhandensein von periportalen Infiltraten oder hämophagozytierenden Makrophagen (Abbildung 2). Nach Infektion mit 2500 PFU LCMV zeigten sich in allen Genotypen vermehrte periportale Infiltrate sowie hämophagozytierende Makrophagen (Abbildung 2). Die Anzahl hämophagozytierender Makrophagen war in den CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäusen höher als bei den WT Mäusen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Tabelle 3).

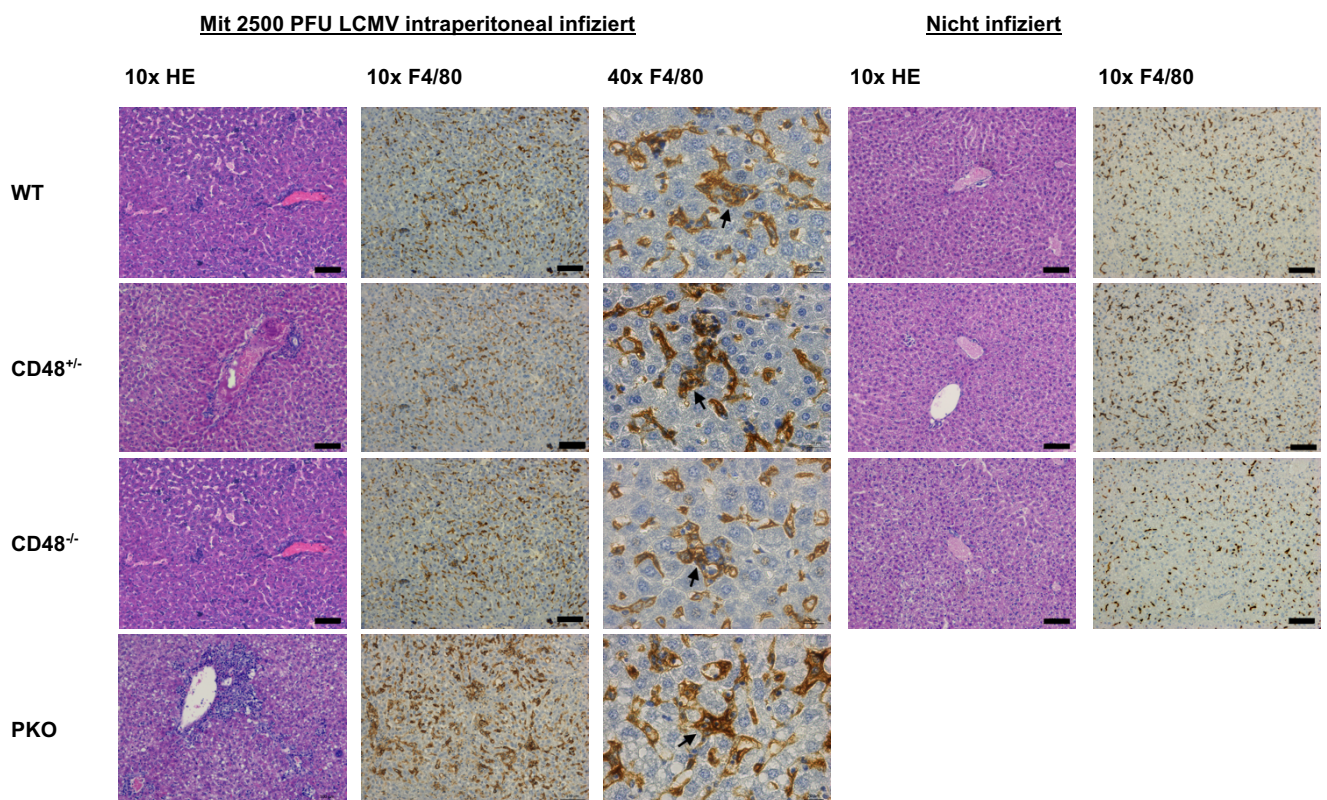


Abbildung 2: Histologische Schnittbilder der Leber

Leberschnitte von nicht-infizierten und LCMV-infizierten WT, CD48^{+/-}, CD48^{-/-} sowie PKO Mäusen, welche mittels Hämatoxylin-Eosin resp. Anti-Makrophagen-Antikörper F4/80 gefärbt wurden. Die Pfeile zeigen vergrößerte Makrophagen mit Hämophagozytose (40x Vergrößerung).

Tabelle 3. Quantifizierung der Hämophagozytose in Leberschnitten

	Anzahl Makrophagen mit Hämophagozytose		
	WT	CD48 ^{+/-}	CD48 ^{-/-}
Mittelwert ± Standardfehler	49.5 ± 5.5	68 ± 1	60.5 ± 10.5
<i>p</i> ¹		ns	ns

Quantifizierung von vergrößerten Makrophagen mit Hämophagozytose. Die Leberschnitte wurden dabei auf zehn Gesichtsfelder (10x Vergrößerung) pro Maus analysiert. Es wurden zwei Mäuse pro Genotyp, die mit 2500 PFU LCMV infiziert wurden, analysiert. Jedes Gesichtsfeld wurde in 20 Quadranten unterteilt. Es wurden pro Maus 100 repräsentative Quadranten ausgezählt. Die Anzahl Makrophagen mit Hämophagozytose ist pro 100 Quadranten angegeben.

¹ Statistische Unterschiede zwischen WT und CD48^{+/-} respektive CD48^{-/-} wurden mittels Welch-Test ermittelt. ns = nicht signifikant

Tabelle 4: Analyse von HLH-Diagnose-Kriterien und INF-γ 11 Tage nach LCMV- Infektion mit 2500 PFU

HLH Parameter	WT	CD48 ^{+/-}	CD48 ^{-/-}	PKO
Fieber/ Hypothermie (°C)	37.12 ± 0.58	35.78 ± 2.57	37.1 ± 0.47	35.33 ± 1.01
Splenomegalie	+	+	+	+
Hämoglobin (g/L)	128.2 ± 7.26	139.5 ± 13.03	145 ± 6.36	94 ± 18.36
Thrombozyten (x10 ³ /μl)	203.6 ± 191.11	186 ± 50.06	158.2 ± 24.15	194 ± 153.52
Leukozyten (x10 ³ /μl)	11.96 ± 7.51	9.03 ± 3.71	5.73 ± 2.53	7.75 ± 2.71
Fibrinogen (mg/ml)	1.29 ± 0.38	1.41 ± 0.14	2.04 ± 0.41	1.20 ± 0.22
Triglyzeride (mmol/L)	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Ferritin (mg/ml)	626.16 ± 1535.30	2893.21 ± 2654.49	1677.95 ± 421.98	8087.62 ± 1966.54
sCD25 (ng/ml)	0.97 ± 0.36	1.06 ± 0.36	0.91 ± 0.13	2.30 ± 0.47
Hämophagozytose (Leber)	(+)	+	+	++
NK-Zell-Aktivität	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
IFN-γ (ng/ml)	0.31 ± 0.43	0.07 ± 0.66	1.19 ± 0.76	27.71 ± 23.11
Total erfüllte Kriterien	2/8	3/8	3/8	5/8

n.g. = nicht gemessen, rot markierte Felder = Kriterium erfüllt

Für die Auswertung wurden 5 WT, 3-5 CD48^{+/-}, 5 CD48^{-/-} sowie 3 PKO Mäuse berücksichtigt.

2.4. Diskussion

Die CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäuse entwickelten nach Infektion mit LCMV eine Entzündungsreaktion mit Schwankungen der Körpertemperatur, Splenomegalie, Zeichen der Hämophagozytose in der Leber, Hyperferritinämie und IL-6 Hyperzytokinämie. Es zeigte sich dabei kein Vollbild der HLH (siehe Tabelle 4), die CD48^{+/-} und CD48^{-/-} Mäuse hatten jedoch signifikant höhere Ferritinspiegel als die WT Mäuse und höhere IL-6 Spiegel, wobei letztere nur bei CD48^{-/-} Mäusen signifikant höher waren als bei den WT Kontrolltieren. Diese Befunde widerspiegeln die beobachteten Laborwerte bei dem Patienten mit Mutation in CD48 und unterstützen die Annahme, dass eine ausreichende Expression von CD48 essentiell ist für die Limitation einer Entzündungsreaktionen, für die korrekte Reifung der NK-Zellen sowie für die Regulation der Empfindlichkeit von Zielzellen gegenüber der NK-Zellen vermittelten Zytotoxizität. Der genaue Mechanismus, der bei einer geringeren CD48 Expression zu einer insuffizienten NK-Zell-Aktivität führt, muss noch weiter untersucht werden. Es muss berücksichtigt werden, dass die Interaktion zwischen CD48 und CD244 bei Mäusen sowohl aktivierende wie inhibierende Effekte auf Immunzellen haben kann, während beim Menschen eher aktivierende Effekte angenommen werden (6, 15). Die Unterschiede zwischen den Genotypen CD48^{-/-} und CD48^{+/-} sind ebenfalls noch unklar und müssen ebenfalls weiter untersucht werden.

In diesem ersten Versuch wurden die Laborwerte einmalig zum Euthanasiezeitpunkt gemessen. Über den Verlauf der Parameter während der Infektion kann daher keine Aussage gemacht werden. In weiteren Experimenten könnten daher Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen, um mehr über den zeitlichen Verlauf zu erfahren. In einem solchen weiteren Experiment könnten dann ebenfalls Messwerte, wie z.B. die Triglyzeride, die bei dem Patienten erhöht waren und für die Diagnose der HLH relevant sind, komplettiert werden. Bei einer insgesamt geringen Anzahl Versuchstiere müssten weitere Messungen durchgeführt werden, um die Reliabilität der Messwerte zu erhöhen.

2.5. Eigenleistung

Zum Zeitpunkt der Vereinbarung waren die Experimente mit den Zellen des Patienten bereits abgeschlossen. Um mich mit dem Thema vertrauter zu machen, habe ich mich anhand verschiedener Publikationen intensiv in das Thema eingelesen. Als Vorbereitung für die Mausexperimente wurde ich durch Benjamin Volkmer und Andrea Mauracher in die Laborarbeit sowie in die Handhabung und den Umgang mit Mäusen eingeführt. Ich half dabei unterstützend bei Mausexperimenten anderer Projekte mit, unter anderem beim Messen der Temperatur und des Gewichts der Mäuse sowie auch bei der Euthanasie und anschliessender Entnahme von Blut und Lymphknoten. Weiter war ich an der Genotypisierung der Versuchstiere beteiligt. Im Februar 2018 besuchte ich den acht Tage dauernden Einführungskurs in die Labortierkunde der Universität Zürich.

Anschliessend wurden gemeinsam mit Benjamin Volkmer die ersten Mausversuche geplant mit dem Ziel die optimale Virusdosis für die weiteren Versuche zu finden. Ende Februar 2018 erfolgte der Start des Mausexperimentes. Meine Aufgaben bestanden aus der intraperitonealen Injektion des Virus, dem regelmässigen Messen des Körpergewichtes, der Temperatur und der Beurteilung des Aktivitäts- und Allgemeinzustandes der Mäuse während des zweiwöchigen Experimentes sowie der Euthanasie mit anschliessender Entnahme von Blut durch Herzpunktion und der Milz sowie der Leber beim Abschluss des Experimentes. Nachdem wir uns für eine optimale Virusdosis entschieden hatten, erfolgten zwei weitere Injektionsrunden. Um einen Überblick über die Daten der verwendeten Mäuse zu gewährleisten, pflegte ich gemeinsam mit Benjamin Volkmer eine Übersichtstabelle. Die Vitalparameter der Mäuse wurden durch mich ausgewertet und graphisch dargestellt. Ich unterstützte Benjamin Volkmer bei der Messung und Darstellung der Laborwerte. Ausserdem war ich an der Diskussion der Befunde beteiligt.

Im Juli 2018 erfolgte die Auswertung der histologischen Schnitte. Ich verglich die Leberschnitte von nicht-infizierten Mäusen mit denjenigen der infizierten Mäuse der verschiedenen Genotypen. Der Hauptfokus lag auf dem Vorhandensein von periportalen Infiltraten und vergrösserten Makrophagen (Kupffer-Zellen), die andere Blutzellen hämophagozytierten. Anschliessend stellte ich die Ergebnisse graphisch dar.

Mit dieser Masterarbeit konnte ich einen umfangreichen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten in der Grundlagenforschung sowie in Tierexperimenten gewinnen. Weiter konnte ich mein Wissen in der Immunologie erweitern. Durch die praktische Arbeit im Labor und mit den Versuchstieren lernte ich zudem neue Fähigkeiten hinzu. Für meine weitere Tätigkeit in der Medizin und Forschung kann ich so wertvolle Erkenntnisse und Erfahrungen mitnehmen.

2.6. Literaturverzeichnis

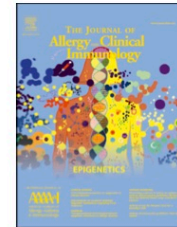
1. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:665-705.
2. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol.* 2016 Mar;164:10-20.
3. Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med.* 1998 Dec;188(11):2083-90.
4. Pahima H, Puzzovio PG, Levi-Schaffer F. 2B4 and CD48: A powerful couple of the immune system. *Clin Immunol.* 2019 Jul;204:64-8.
5. Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol.* 2016 Feb;38:45-51.
6. Waggoner SN, Kumar V. Evolving role of 2B4/CD244 in T and NK cell responses during virus infection. *Front Immunol.* 2012;3:377.
7. Brisse E, Wouters CH, Matthys P. Advances in the pathogenesis of primary and secondary haemophagocytic lymphohistiocytosis: differences and similarities. *Br J Haematol.* 2016 07;174(2):203-17.
8. Henter JL, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Feb;48(2):124-31.
9. Alkhairy OK, Perez-Becker R, Driessen GJ, Abolhassani H, van Montfrans J, Borte S, et al. Novel mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, immunologic, and genetic characterization of human CD27 deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Sep;136(3):703-12.e10.
10. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell.* 2007 Feb;25(3):331-43.
11. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018 01;38(1):129-43.
12. Brisse E, Wouters CH, Matthys P. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): A heterogeneous spectrum of cytokine-driven immune disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Jun;26(3):263-80.
13. Pachlopnik Schmid J, Schmid JP, Côte M, Ménager MM, Burgess A, Nehme N, et al. Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):10-23.
14. Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood.* 2004 Aug;104(3):735-43.
15. Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL, Phillips JH. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol.* 2000 Jun;37(9):493-501.

3. Publikation

Journal Pre-proof

Recurrent inflammatory disease caused by a heterozygous mutation in CD48

Benjamin Volkmer, PhD, Raquel Planas, PhD, Emanuel Gossweiler, Anna Lünemann, PhD, Lennart Opitz, MSc, Andrea Mauracher, MD PhD, Ursina Nüesch, PhD, Tenzin Gayden, PhD, Daniela Kaiser, MD, Barbara Drexel, MD, Claudia Dumrese, PhD, Nada Jabado, MD PhD, Stefano Vavassori, PhD, Jana Pachlopnik Schmid, MD PhD



PII: S0091-6749(19)31038-3

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.038>

Reference: YMAI 14128

To appear in: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Received Date: 2 April 2019

Revised Date: 4 July 2019

Accepted Date: 31 July 2019

Please cite this article as: Volkmer B, Planas R, Gossweiler E, Lünemann A, Opitz L, Mauracher A, Nüesch U, Gayden T, Kaiser D, Drexel B, Dumrese C, Jabado N, Vavassori S, Schmid JP, Recurrent inflammatory disease caused by a heterozygous mutation in CD48, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.038>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2019 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.

Recurrent inflammatory disease caused by a heterozygous mutation in CD48

Benjamin Volkmer, PhD¹, Raquel Planas, PhD¹, Emanuel Gossweiler¹, Anna Lünemann, PhD², Lennart Opitz, MSc^{1,3}, Andrea Mauracher, MD PhD¹, Ursina Nüesch, PhD¹, Tenzin Gayden, PhD^{4,5}, Daniela Kaiser, MD⁶, Barbara Drexel, MD^{1,7}, Claudia Dumrese, PhD⁸, Nada Jabado, MD PhD^{4,5}, Stefano Vavassori, PhD¹, Jana Pachlopnik Schmid, MD PhD^{1,9,*}

¹Division of Immunology, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland.

²Institute of Experimental Medicine, University of Zurich, Zurich, Switzerland.

³Functional Genomics Center Zurich, University of Zurich/ETH Zurich, Zurich, Switzerland.

⁴Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada.

⁵Department of Pediatrics, McGill University, Montreal, Canada.

⁶Children's Hospital Lucerne, Lucerne, Switzerland.

⁷Private office (KinderAllergieDoktor), Zurich, Switzerland.

⁸Flow Cytometry Facility, University of Zurich, Zurich, Switzerland.

⁹University of Zurich, Switzerland.

*Corresponding author: Prof. J. Pachlopnik Schmid, MD, PhD, Assistant Professor Pediatric Immunology, Division of Pediatric Immunology, University Children's Hospital Zurich, Steinwiesstr. 75, CH-8032 Zurich, Switzerland. Phone: +41 44 266 73 11. Fax: +41 44 266 79 14. E-Mail: jana.pachlopnik@kispi.uzh.ch

Disclosure statement: J. Pachlopnik Schmid has received consultancy fees from Novartis and is member of the advisory board of SOBI for Emapalumab in primary HLH. The other authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Capsule Summary: Sufficient cell surface expression of CD48 is needed to (i) control inflammation, (ii) ensure correct natural killer cell maturation and function, and (iii) regulate target cell susceptibility to cytotoxicity.

Keywords: hyperinflammatory syndrome, monogenic immune disease, CD48, cytotoxicity

Abbreviations: B-LCL, B-lymphoblastoid cell line; CADD, combined annotation dependent depletion; EBV, Epstein-Barr virus; ExAc, Exome aggregation consortium; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis, IFN, interferon; IL, interleukin; LAT, linker for activation of T cells, NK, natural killer; WES, whole-exome sequencing.

Funding Sources: This study was funded by a Robert A Good/Jeffrey Modell Fellowship to J.P.S., a private donation from Joe and Regula Eberhard to B.V. and J.P.S., and grants from the Clinical Research Priority Program to J.P.S. and R.P., and from the Béatrice Ederer-Weber and the Helmut Horten foundation to J.P.S. and S.V.

To the Editor:

Inherited defects in the granule-dependent cytotoxicity of lymphocytes cause hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) [1]. The signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) family members CD48 (SLAMF2, BLAST-1) and CD244 (SLAMF4, 2B4) are important co-activating receptors in the regulation of lymphocyte cytotoxicity [2, 3]. CD48 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored Ig-like protein C expressed on nearly all cells of hematopoietic origin, and it interacts with its high-affinity receptor 2B4 on cytotoxic cells [4]. In mice, signaling via 2B4 can be either costimulatory or coinhibitory, whereas there is evidence of a predominantly activating role in humans [5, 6].

We investigated the molecular basis of a recurrent inflammatory disease characterized by fever, polymorphic rashes, splenomegaly, pancytopenia, an elevated proportion of HLA-DR⁺ CD8 T cells, hyperferritinemia, hypertriglyceridemia (fasting triglyceride level: 7.42 mmol/l; reference: <1.7), signs of hemophagocytosis in the bone marrow, and hypercytokinemia observed from the age of 9 months onwards in a Caucasian patient now 22 years of age (Fig. 1A+B, Table S1, Fig. S1). With regard to the hypercytokinemia, the patient's elevation of interleukin (IL)-6 was more pronounced than that of interferon (IFN)- γ and soluble CD25 (sCD25) when compared with patients with familial HLH. Free IL-18 levels only rose slightly during one of the inflammatory episodes. Apart from an occasional need for supportive care (thrombocyte transfusions), the patient recovered spontaneously from these episodes within 4 to 7 days; however, mild splenomegaly and CD4 lymphopenia were also noted between episodes (Tables S1+S2). Importantly, we could not identify an infectious trigger; in particular, a PCR assay for Epstein-Barr virus in blood samples was repeatedly negative. Since the patient met the criteria for HLH (i.e. fever, splenomegaly, bicytopenia, hyperferritinemia, hypertriglyceridemia, and bone marrow hemophagocytosis) [7], we considered (and ruled out) known forms of hereditary HLH by running functional assays and genetic tests (Fig. S2). The only mutation found in an HLH-associated gene was *STX11* (c.616G>A, p.Glu206Lys, HET; also present in the healthy father. Given the autosomal recessive inheritance in *STX11* deficiency, this heterozygous mutation was not considered to be the prime cause of the patient's disease. Autoinflammatory and autoimmune diseases were also ruled out (Suppl. clinical details).

After whole-exome sequencing (WES) of peripheral blood genomic DNA and then downstream bioinformatic filtering, we identified 2 gene variants that segregated with the disease (Figure 1C, Table S4). A *de novo* mutation in *CD48* (c.659C>A, p.S220Y, HET) was considered to be the most plausible candidate (Fig. 1D, Fig. S3) because it was not found in the patient's family, 97 other exomes sequenced and analyzed in-house, or the NCBI dbSNP database (v147). This mutation is predicted to be harmful, since (i) the S220 residue is the GPI anchor's attachment site (the anchor is unlikely to attach to CD48-220Y), and (ii) both Sorting Intolerant from Tolerant and Polyphen2 analyses predicted that the CD48^{S220Yhet} mutation would damage protein function. The numbers of WES reads and RNAseq reads were similar to control values (Fig. S3). The second variant in an immunity-associated gene (*GAB3*, NM_001081573.2:c.712C>T (Table S5), was discarded because of its low CADD score (0.139) and the high minor allele frequency in ExAC (4.1%). The patient displayed abnormally low cell surface levels of CD48 (Fig. 1E+F), whereas intracellular CD48 levels were similar to control values (Fig. S4). Cell surface CD48 expression was also markedly lower on HEK293-cells transfected with CD48^{S220Yhet} than in those transfected with CD48-*wt*, although mRNA levels were similar (Fig. S5). Furthermore, serum levels of soluble CD48 were significantly lower than control values (Figure 1G).

The patient showed a higher proportion of CD56^{bright} natural killer (NK) cells in peripheral blood, along with stronger IFN γ expression by NK cells upon IL-12 stimulation (Fig. 2A-C). The patient also had a higher proportion of the less differentiated CD56^{bright} CD94^{high} NK cells (vs. controls), and a lower proportion of the more differentiated CD56^{dim} CD94^{low} NK cells (which reportedly are highly cytotoxic) (Fig. 2D, Fig. S6). Transcriptomic analysis of PHA-stimulated PBMCs revealed higher overall levels of cytokine mRNA expression, including IL-6 mRNA (Fig. 2E). In a gene set enrichment analysis of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, the "cytotoxic cells" biological function (hsa04650) was most affected (Table S6). The differentially expressed cytotoxicity-related genes belonged to branches controlled by the CD48-2B4 interaction (Fig. 2E). LAT-regulated cytokine and PLC γ transcripts were upregulated under stimulatory conditions and (to a lesser extent) under resting conditions (Fig. S7). Higher activity of the LAT-mediated branch of 2B4 signaling was also evidenced by the upregulation of several target genes (TNF α , IFN γ and perforin; Fig. 2E). Transcription of EAT-2 (a negative-regulator

of the SAP-mediated 2B4-pathway that controls NK-cell activation) was also upregulated. These findings suggest that abnormally low CD48 levels cause a defect in 2B4-mediated NK cell activation.

CD48-dosage-dependent killing by NK cells has been reported previously [8, 9]. We evaluated the impact of the CD48^{S220Yhet} mutation on NK-cell-mediated cytotoxicity. After immortalization by EBV, the patient's B-lymphoblastoid cell lines (B-LCL) expressed low levels of CD48 expression (data not shown). When compared with healthy controls, the CD48^{S220Yhet} patient-derived NK cells showed lower NK cytotoxicity towards autologous B-LCLs (Fig. 2G). Degranulation of NK cells of a healthy donor was lower upon stimulation with autologous B-LCL cells pre-incubated with inhibitory anti-CD48 antibody than upon stimulation with autologous B-LCL cells pre-incubated with isotype control antibody or without any prior addition of antibodies. (Fig. 2H). Thus, NK-cell degranulation was decreased by masking CD48 on autologous target cells, showing that the amount of CD48 on target cells regulates susceptibility to cytotoxicity. To further evaluate the effect of CD48^{S220Yhet} mutation, we performed a killing assay with CD48^{S220Yhet} HEK293 cell lines transfected with plasmids encoding CD48-wt or CD48^{S220Yhet} as targets and the NK92 cell line as killers, we observed that the CD48-wt were killed more efficiently (Fig. 2I). Thus, CD48^{S220Yhet} increases target-cell resistance to cell-mediated cytotoxicity.

To address the impact of reduced CD48-expression on systemic inflammation, we infected CD48^{+/-} and CD48^{-/-} mice with lymphocytic choriomeningitis virus. We observed exaggerated inflammation, with hyperferritinemia and (to a lesser extent) IL-6 hypercytokinemia in both strains, together with a slight elevation of sCD25 levels (Fig. 2J) - mirroring the laboratory parameters observed for the patient with CD48^{S220Yhet} during flares.

We present here a patient with a unique inflammatory phenotype. The clinical significance of a genetic variant in a single patient needs to be interpreted with caution and is supported here by similar systemic inflammatory findings in a mouse model. Our study provides evidence that sufficient cell surface CD48 expression is needed to (i) control inflammation, (ii) ensure correct natural killer cell maturation and function, and (iii) regulate target cell susceptibility to cytotoxicity.

Journal Pre-proof

Acknowledgements:

The authors thank the patient and his family for their participation in this study, Prof. Dr. Christian Münz for helpful discussions, Dr. Sylvain Latour and his team for measuring NK T cells, Prof. Dr. Cem Gabay and Dr. Charlotte Girard for measuring IL-18 serum levels, Dr. Elena Kuzmenko for help with degranulation assays, Prof. Dr. Stephan Ehl for helpful discussions and for measuring SAP- and XIAP-expression, Dr. Geneviève de Saint Basile for measuring T cell cytotoxicity to L1210 target cells, Dr. Peter Aichele for providing lymphocytic choriomeningitis virus, Dr. Josef Pollak for caring for the patient, and Dr. David Fraser for proofreading the manuscript.

Benjamin Volkmer, PhD¹
 Raquel Planas, PhD¹
 Emanuel Gossweiler¹
 Anna Lünemann, PhD²
 Lennart Opitz, MSc^{1,3}
 Andrea Mauracher, MD PhD¹
 Ursina Nüesch, PhD¹
 Tenzin Gayden, PhD^{4,5}
 Daniela Kaiser, MD⁶
 Barbara Drexel, MD^{1,7}
 Claudia Dumrese, PhD⁸
 Nada Jabado, MD PhD^{4,5}
 Stefano Vavassori, PhD¹
 Jana Pachlopnik Schmid, MD PhD^{1,9,*}

From

¹Division of Immunology, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland.

²Institute of Experimental Medicine, University of Zurich, Zurich, Switzerland.

³Functional Genomics Center Zurich, University of Zurich/ETH Zurich, Zurich, Switzerland.

⁴Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada.

⁵Department of Pediatrics, McGill University, Montreal, Canada.

⁶Children's Hospital Lucerne, Lucerne, Switzerland.

⁷Private office (KinderAllergieDoktor), Zurich, Switzerland.

⁸Flow Cytometry Facility, University of Zurich, Zurich, Switzerland.

⁹University of Zurich, Switzerland.

Journal Pre-proof

References

1. Pachlopnik Schmid J, Côte M, Ménager MM, Burgess A, Nehme N, Ménasché G et al. Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. *Immunol Rev* 2010; 235:10-23.
2. Liu D, Bryceson YT, Meckel T, Vasiliver-Shamis G, Dustin ML, Long EO. Integrin-dependent organization and bidirectional vesicular traffic at cytotoxic immune synapses. *Immunity* 2009; 31:99-109.
3. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol* 2016; 164:10-20.
4. Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 1998; 188:2083-90.
5. Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL, Phillips JH. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol* 2000; 37:493-501.
6. Bloch-Queyrat C, Fondanèche MC, Chen R, Yin L, Relouzat F, Veillette A, Fischer A, Latour S. Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* 2005; 202:181-92.
7. Henter JJ, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48:124-31.
8. Kim EO, Kim TJ, Kim N, Kim ST, Kumar V, Lee KM. Homotypic cell to cell cross-talk among human natural killer cells reveals differential and overlapping roles of 2B4 and CD2. *J Biol Chem* 2010; 285:41755-64.
9. Elias S, Yamin R, Golomb L, Tsukerman P, Stanitsky-Kaynan N, Ben-Yehuda D. Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood* 2014; 123:1535-43.

Figure 1. Clinical and immunological characteristics of a patient with a heterozygous point mutation in *CD48*. (A) Hematological parameters measured during inflammatory flares (red dots) or during remission (yellow dots) - all between the ages of 12 and 18; age-matched reference values (blue bars). (B) Serum levels of IFN- γ , IL-6, sCD25 and IL-18 in healthy controls (CTRL), patients with familial HLH type 3 (FHL3), the index patient (Patient), and

patients with macrophage activation syndrome and secondary HLH (MAS/2ry HLH). (C) The index patient's pedigree. Squares: males, circle: female, filled symbol: index patient. (D) Schematic model of the CD48 protein (immunoglobulin domains in green, GPI anchor in blue, mutated S220Y position in red). (E) Representative histograms showing CD48 cell-surface expression. (F) CD48 cell surface expression on leukocyte subsets from healthy controls (black) and the patient (red; central dot: during a flare). (G) Serum sCD48 concentrations measured in controls (black), FHL3 patients (blue) and the index patient (red). Thick line: mean; error bars: SD. Statistical significance in an unpaired, two-tailed Student's *t*-test: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ns: not significant.

Figure 2. Functional consequences of low cell surface CD48. (A) NK cells (CD3^{-ve} CD56^{+ve}) in lymphocyte fraction. (B) CD56^{bright} NK cells in healthy controls (black) and the patient (red dot: during flares; red circle: in remission). (C) IFN- γ -expressing NK cells following IL-12 stimulation (controls in black, patient in red). (D) Percentage of NK cell subsets (controls in black, patient during episode in red dots, patient in remission in red circles). Thick line/bar: mean; error bars: SD. (E) Transcriptomics analysis of PHA-stimulated PBMCs from a healthy control (CTRL) or the patient (upregulated cytokine transcripts, blue dots). (F) Transcriptomic analysis of 2B4 signaling in PHA-stimulated PBMCs (upregulated in red, downregulated in blue). (G) Fraction of surviving B-LCL target cells after incubation with autologous primary NK target cells (mean of n=2). (H) Box whiskers showing the normalized fraction of NK cells degranulating after co-culture with autologous B-LCL with (B-LCL + α CD48) or without (B-LCL) CD48-blocking antibody or isotype control (B-LCL + mIgM) in four independent experiments. (I) Fraction of CD48^{WT} (black bar) or CD48^{S220Y} (red bar) transfected HEK293 cells killed by NK-92 cells in quadruplicate experiments. (J) Whisker plots showing plasma ferritin, IL-6 and sCD25 in wild-type (WT, n=5), CD48^{+/-} (n=3-5) and CD48^{-/-} (n=5) mice 12 days after LCMV-WE infection. Statistical significance: unpaired, two-tailed Student's *t*-test or ANOVA with multiple comparisons for Fig. 2H: **p*<0.05, ***p*<0.01, ns: not significant.

Figure 1

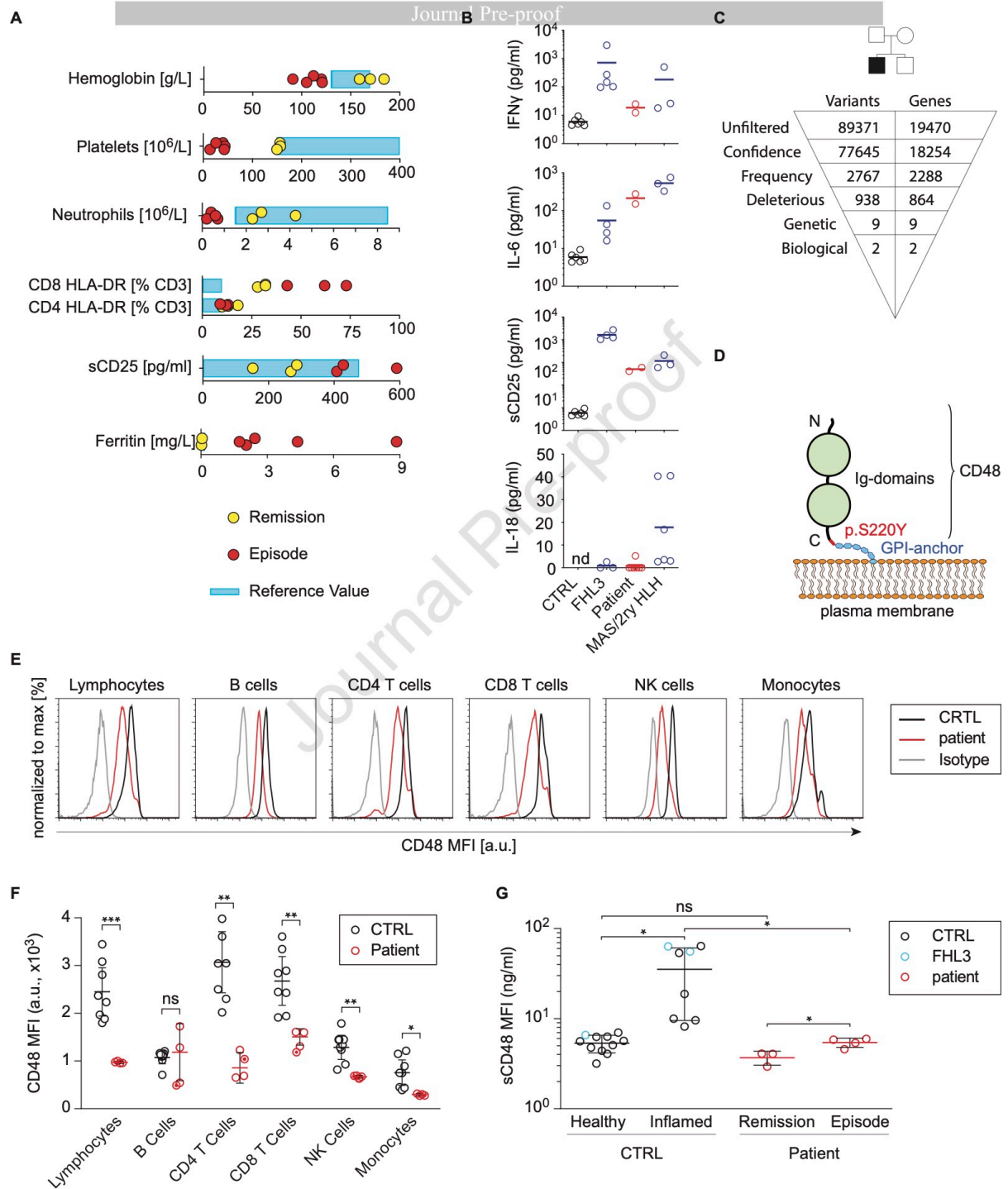
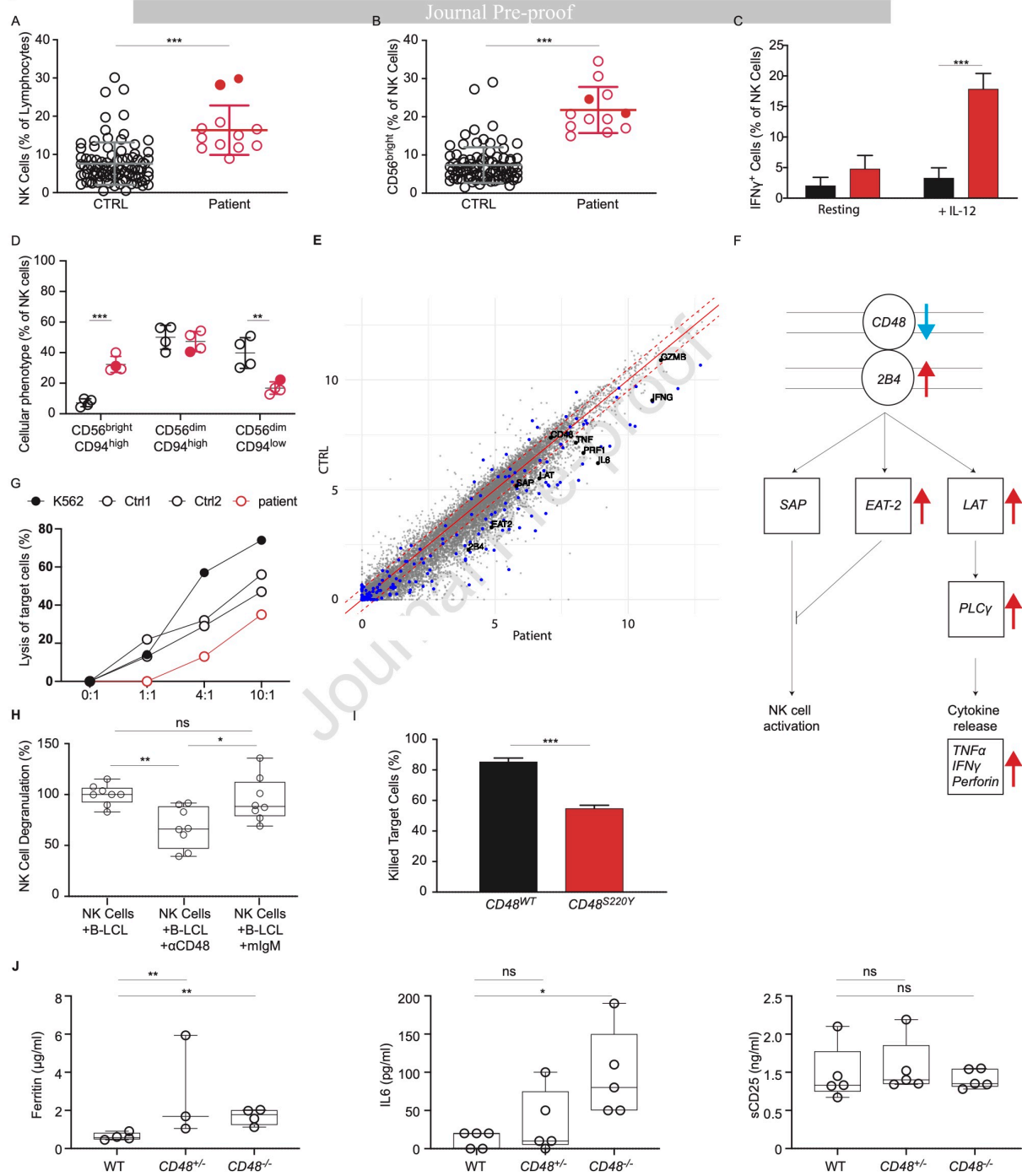


Figure 2



Supplemental Material to: “Recurrent inflammatory disease due to a heterozygous mutation in CD48” by Volkmer B. et al.

Supplemental clinical details: differential diagnosis

Haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): The patient’s clinical phenotype during episodes of fever (fever, splenomegaly, bi-cytopenia, hyperferritinemia, hypertriglyceridemia, and hemophagocytosis in the bone marrow: Suppl. Fig. 1, Suppl. Table 1, 2 and 3) met six of the eight criteria for HLH¹, i.e. more than the five out of eight needed for a diagnosis of HLH. Known hereditary forms of HLH were ruled out by Sanger sequencing of *PRF1*, *UNC13D*, *STXBP2*, *RAB27A*, *SH2D1A*, and *XIAP*. Consistently, the patient’s lymphocytes expressed normal levels of perforin (Suppl. Fig. 2), SAP and XIAP (data not shown) proteins. Likewise, the NKT cell count (which can be low in patients with SAP and XIAP-mutations) was normal (Suppl. Table 2). Sanger sequencing of *STX11* revealed a heterozygous c.616G>A, p.Glu206Lys mutation, which was also present in the healthy father. Given the autosomal recessive inheritance of STX11 deficiency, this heterozygous mutation was not considered to be the prime cause of the disease. There were no degranulation defects in the patient’s NK cells after stimulation with K652 cells, and normal T cell cytotoxic activity was observed with L1210 cells as targets (Suppl. Fig. 2). Under the microscope, there were no giant granules in the leukocytes in a blood smear, and no pigment aggregates in hair shafts. Natural killer cell degranulation was normal, and so there were no signs of Chédiak Higashi or Griscelli syndrome. Metabolic diseases potentially associated with an HLH-like phenotype (such as lysinuric protein intolerance and Wolman syndrome) were ruled out. Hence, our work-up did not reveal any signs of hereditary HLH.

Autoimmune diseases: Classical autoimmune diseases are mediated by autoantibodies and/or autoreactive T lymphocytes, and develop as either systemic or organ-specific conditions. The patient did not have any autoantibodies; repeated serum assays for antinuclear autoantibodies, antithyroid antibodies, antilymphocyte antibodies and antithrombocyte antibodies were always negative. The patient had never suffered from diseases that might be associated with autoreactive T cells (such as diabetes mellitus type 1, multiple sclerosis, celiac disease, and perhaps juvenile idiopathic arthritis) or from chronic diarrhea or arthritis. He did not meet the conventional diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus.

Autoinflammatory syndromes/periodic fever syndromes: We also considered periodic fever syndromes, even though our patient did not meet the conventional diagnostic criteria for any of the most common conditions of this type (Suppl. Table 3). Concerning the Tel Hashomer criteria for familial Mediterranean fever syndrome (FMF), the index patient met one major criterion (fever alone). None of the minor criteria was met (except that the response to colchicine was not tested in our patient) but the patient met the 5 supportive criteria. No erysipelas and no serositis were noted. Although the Tel Hashomer criteria are very successful in diagnosing patients with FMF, their specificity in children is reportedly low (54.6%). We therefore evaluated the patient’s clinical features for another set of criteria (those published by Yalcinkaya et al.) that might be more appropriate in children. However, our patient did not meet these criteria for FMF either. Sanger sequencing did not find any disease-causing mutations in the genes (*NLRP3*, *MEFV*, *TNFRSF1A* and *MVK*) associated with the most common periodic fever syndromes.

None of the clinical criteria for TNF-receptor associated periodic fever syndromes (TRAPS: periorbital edema, episode duration > 6 days, migratory rash with centrifugal migration, myalgia and/or affected relatives) was met. Therefore, the TRAPS criteria were not included in our Suppl. Table 3. Furthermore, Sanger sequencing did not reveal any mutations in the exons of *TNFRSF1A*. The patient does not suffer from any of the following autoinflammatory syndromes: Blau’s syndrome, Majeed syndrome, deficiency of interleukin-1 receptor antagonist, pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome, Behcet’s disease or Crohn’s disease. Likewise, the patient did not bear any mutations in *NLRP4* (as assessed by whole-exome sequencing (WES)) and had never presented with serositis, arthritis,

musculoskeletal diseases, neutrophilia, sterile neutrophilic inflammatory infiltrates in organs or hyperfibrinogenemia (i.e. signs typically seen in autoinflammatory diseases).

We furthermore considered systemic onset juvenile idiopathic arthritis (sJIA), since it can occur in the absence of arthritis. Recurrent macrophage activation syndrome can be a complication in sJIA (as mentioned in the “2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis”).^{2,3} However, since we did not observe any other typical signs (spiking fever or typical sJIA rashes) or laboratory signs (other than recurrent macrophage activation syndrome) of sJIA, we decided to rule out this condition as a relevant diagnosis.

Other differential diagnoses: The patient had no neurological signs or symptoms and no signs of malignant disease.

Supplemental Table 1. **Splenomegaly, measured at different time points**

Age	During a flare	Length (cm)	Reference range (cm)
14 years and 2 months	Yes	17.8	(9.5 – 12.5)
14 years and 4 months	No	13.0	(9.5 – 12.5)
14 years and 5 months	Yes	16.9	(9.5 – 12.5)
15 years and 8 months	Yes	16.7	(9.5 – 12.5)
16 years and 1 months	Yes	18.4	(9.5 – 12.5)

Supplemental Table 2. The index patient's immune phenotype.

	During a flare	During remission	Normal values
Lymphocyte count, per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.3 – 0.9	1.1 – 1.3	1.4 – 3.3
T cell subpopulation counts			
CD3 ⁺ count per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.27 – 0.71	0.90 – 1.05	0.80 – 3.50
CD4 ⁺ count per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.07 – 0.08	0.30 – 0.43	0.40 – 2.10
CD8 ⁺ count per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.19 – 0.57	0.52 – 0.53	0.20 – 1.20
NKT count per 10^6 CD3+	nd	264 – 289	250 – 1900
CD31 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ count (%)	0.00 – 0.00	0.05 – 0.08	0.16 – 1.20
T cell proliferation (cpm $\times 10^{-3}$) to:			
Phytohemagglutinin	nd	201	>100
Anti-CD3 antibody	nd	292	>100
PMA + ionomycin	nd	280	>100
<i>Candida</i> antigen	nd	42	>10
CMV	nd	39	>10
Tetanus toxoid	nd	9	>10
B cells			
CD19 ⁺ count per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.00 – 0.02	0.10 – 0.22	0.16 – 0.60
Natural killer cells			
CD56 ⁺ CD16 ⁺ count per $\mu\text{l} \times 10^{-3}$	0.00 – 0.02	0.08 – 0.09	0.07 – 1.20
Immunoglobulin levels (g/l)			
IgM	0.56 – 0.64		0.58 – 1.82
IgG	8.50 – 9.61		7.30 – 12.30
IgG1	5.03 – 5.78		4.90 – 11.40
IgG2	1.21 – 1.33		1.50 – 6.40
IgG3	1.15 – 1.27		0.20 – 1.10
IgG4	0.21 – 0.28		0.08 – 1.40
IgA	0.58 – 0.68		1.09 – 2.74
Post-immunization antibodies			
Anti-tetanus toxoid IU/l		391	>100
Anti- <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ug/ml)		1.58	>1.00

The patient's peak and trough leukocyte subset counts and immunoglobulin levels (the average of three independent measurements) between the ages of 13 and 18 are compared with age-adjusted reference values.⁴ The results of T cell proliferation assays following stimulation with the indicated mitogens or antigens come from a representative experiment. Out-of-range values are indicated in bold. Abbreviations: CD: cluster of differentiation; CMV: cytomegalovirus; cpm: counts per minute; Ig: immunoglobulin; n.d.: not determined; PMA: phorbol myristate acetate.

HLH	No	CAPS	No	FMF	No	PFAPA	No	Exonic mutations in <i>MFV</i>	No	MKD	No
*Exonic homozygous or compound heterozygous mutations in primary HLH genes		Exonic mutations in <i>NLRP3</i>		Exonic mutations in <i>MEFV</i>		N/A					
Five of the following 8 criteria (according to Henter et al. 2007):		Mandatory criterion, plus >2 of 6 typical signs/symptoms of CAPS (adapted from Kuehnel-Dachner et al. 2016):		**The Tel Hashomer criteria :		Criteria for FMF in children, according to Yalcinkaya et al. 2009		Clinical criteria (Vanoni et al.)		Provisional clinical classification criteria (Federici et al. 2015): score ≥ 42	
Criteria:	Met?	Criteria:	Met?	Criteria:	Met?	Criteria:	Met?	Criteria:	Met?	Criteria:	Met?
Fever ≥38.5 °C	Yes	Mandatory: Raised inflammatory markers (CRP/SA)A	Yes	Major criteria, typical attacks		Axillary temperature of > 38.0 °C, 6-72h duration, ≥ attacks	Yes	Regularly recurring fever with an early age of onset (<5 years)	Yes	Age at onset <2 years (Score 10)	Yes
Splenomegaly (palpable below costal margin or increased size on imaging)	Yes	Plus >2 of 6 CAPS typical signs/symptoms:		- 1. Peritonitis (generalized) - 2. Pleuritis (unilateral) or pericarditis - 3. Monoarthritis (hip, knee, ankle) - 4. Fever alone	No No No Yes	Abdominal pain, 6-72h duration, ≥ attacks	No	Constitutional symptoms in the absence of upper respiratory infections with at least 1 of the following clinical signs:		Aphthous stomatitis (Score 11)	No
Cytopenia (affecting ≥2 out of the 3 lineages):	Yes	Urticaria-like rash	(Yes)	Minor criteria		Chest pain, 6-72h duration, ≥ attacks	Yes	a) aphthous stomatitis	No	Generalized enlargement of lymph nodes or splenomegaly (Score: 8)	Yes, splenomegaly but only during episodes
Hemoglobin <90 g/l; in newborns: <100 g/l	Yes Yes	Cold-/stress-triggered episodes	No	1-3. Incomplete attacks involving 1 or more of the following sites: - 1. Abdomen - 2. Chest - 3. Joint - 4. Exertional leg pain - 5. Favorable response to colchicine	No No No No No Not tested	Arthritis, duration of attacks 6-72h, oligoarthritis	No	b) cervical lymphadenitis	No	Paired lymph nodes (Score 13)	No
Neutrophilic granulocytes (<1.0 × 10 ⁹ /l)	Yes										
Platelet count (<100 × 10 ⁹ /l)	Yes	Sensorineural hearing loss	No	Supportive criteria		Family history FMF	No	c) pharyngitis	No	Diarrhea sometimes/often (Score 20)	No
Hemophagocytosis (in the bone marrow or CSF)	Yes	Musculoskeletal symptoms (arthralgia/arthritis/myalgia)	No							Diarrhea always (Score 37)	No
Hyperferritinemia (≥500 mg/l)	Yes	Chronic aseptic meningitis	No	1. Family history of FMF 2. Appropriate ethnic origin 3. Age <20 y at disease onset (4-7: Features of attacks) 4. Severe, requiring bed rest 5. Spontaneous remission 6. Symptom-free interval 7. Transient inflammatory response 8. Episodic proteinuria/ hematuria 9. Unproductive laparotomy or removal of white appendix 10. Consanguinity of parents	No Yes Yes Yes Yes No No No			Completely asymptomatic between episodes	Yes (apart from mild CD4 lymphopenia and low naive CD4T cells)	Absence of chest pain (Score 11)	Yes
Hyperlycopenia (fasting level: ≥3.0 mmol/l)	Yes										
Hypertriglyceridemia (≥1.5 g/l)	Yes										
Elevated soluble CD25 (≥2000 U/l)	No	Skeletal abnormalities (epiphyseal overgrowth/frontal bossing)	No					Normal growth and development	Yes		
Low NK cell cytotoxicity	No										
Criteria met in the index patient?	Yes		No		No		No		No		No (Score 29, cut-off 42)

***Molecular diagnosis consistent with the disease (Sanger sequencing)**

** A heterozygous E205K mutation in STX11 was found in the index patient. STX11 deficiency is inherited in an autosomal recessive manner. A heterozygous E205K mutation has been reported in a healthy parent of a patient with HLH.² The result of a degranulation assay with NK cells in the presence of K562 cells was normal, proving that the heterozygous E205K mutation did not result in a major functional impairment in degranulation. No disease-causing mutations were found in *PRF1*, *UNC13D*, *Munc18-2*, *STX11**, *RAB27A*, or *LYST* and/or exonic mutations in *SH2D1A*, or *BIRC4*.

The Tel Hahomer criteria (adapted from Livneh et al, Arthritis & Rheumatism 1997⁶) required for a diagnosis of FMF are **≥1 major criteria, or ≥2 minor criteria, or 1 minor criterion plus ≥5 supportive criteria, or 1 minor criterion plus ≥4 of the first 5 supportive criteria

CAPS: cryopyrin-associated periodic fever syndrome; FMF: familial Mediterranean fever syndrome; HLH: hemophagocytic lymphohistiocytosis; MKD: mevalonate kinase deficiency ("Hyper-IgD syndrome"); N/A: not applicable; PFAPA: periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis. Criteria as described in ^{1,3-10}.

Supplemental Table 4. Gene variants in the index patient (according to WES).

Chrom.	Position	Gene	GeneID	Codon Change	Amino Acid Change	Zygosity	SIFT	Poly
1	160648915	CD48	ENSG00000117091	c.659C>A	p.Ser220Tyr	HET	deleterious	deleterious
X	153940861	GAB3	ENSG00000160219	c.712C>T	p.Pro238Ser	HOM	tolerated	benign

Gene variants (listed by chromosome number) were filtered as described in the Methods, and are involved in an “immune system process” as defined by gene ontology (GO:0002376) with a mean allele frequency below 0.05 according to dbSNP.¹¹ The predicted variant effects on the protein are indicated for Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT)¹² and Polyphen2_HDIV (Poly) analyses.¹³

Supplemental Table 5: Expression of genes identified by WES.

Gene	Resting			PHA-stimulated		
	Patient cells	Control cells	log2 ratio	Patient cells	Control cells	Log2 ratio
CD48	4133	6533	-0.66	3425	4526	-0.40
GAB3	759.1	476	0.67	452.7	280.8	0.69

Gene expression in the patient and a healthy control for the gene variants listed in Suppl. Table 4, as determined by RNAseq. The log2 ratios were calculated from the individual gene expression values (normalized counts) in either resting or PHA-stimulated cells.

Supplemental Table 6. Association of gene expression patterns with affected biological functions.

Gene Set	Description	Gene Size	Leading Edge Number	ES	NES	P Value	FDR
hsa04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	100	35	0.56588	2.1912	0	0
hsa03010	Ribosome	131	67	-0.52373	-2.3856	0	0
hsa05322	Systemic lupus erythematosus	68	20	0.56307	2.0009	0	0.015304
hsa05143	African trypanosomiasis	26	6	0.67622	2.004	0.0016722	0.020661
hsa04612	Antigen processing and presentation	68	25	0.54818	1.9549	0	0.024391

Differential gene expression pattern in patient PBMCs vs. healthy control PBMCs after PHA stimulation, in a gene set enrichment analysis for the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Materials and methods

Study approval

All study participants gave their written, informed consent. The study was approved by the local investigational review board (Zurich, Switzerland; reference: KEK-ZH-2015-0555) and registered at ClinicalTrials.gov (NCT02735824).

Whole-exome sequencing and bioinformatics

One microgram of genomic DNA was enriched using the Agilent Human All Exon V4 kit (Agilent technologies), according to the manufacturer's protocol. For lists of screened genes and assayed regions, see earray.chem.agilent.com/suredesign. Whole-exome libraries were sequenced on an Illumina HiSeq2500 system for 2 x 101 cycles, according to the manufacturer's instructions (Illumina). All raw sequencing reads were quality-checked on FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Before mapping, the low-quality ends of the reads were clipped (hard-trimming of 3nt from the read start, and soft-trimming at the read end). The sequence was aligned against Ensembl GRCh37.p13 by using Bowtie2 2.2.3 with the following specific options: “no-mixed” – “no-discordant” – “very-sensitive”. The resulting maps were converted into BAM file format using samtools 0.1.19. Coverage distributions for the set of targeted bases were checked using the Target Enrichment Quality Control Bioconductor package (UNAVCO). Average coverage across the capture region was 70-152x, and the coverage was >30x in 85%-97% of capture sites. Initial maps were post-processed using GATK 3.3-0 (broadinstitute.org/gatk), according to their “best practices protocol v4”. In brief, reads were realigned around sites of known insertions and deletions (INDELs), likely PCR duplicates were detected using Picard 1.119 (picard.sourceforge.net), and raw base quality scores were recalibrated. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and short INDELs were identified using the HaplotypeCaller from GATK. Variants were classified as novel or known variants deposited in dbSNP 142. The likely functional consequences of each variant were annotated using snpEff 2.4.1a (snpeff.sourceforge.net) for ENSEMBL 76 human gene models. Potentially deleterious effects were evaluated using PolyPhen2, SIFT, MutationTaster (mutationtaster.org), GERP++ (mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp), LRT (genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query), ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and OMIM (ncbi.nlm.nih.gov/omim), if available. Variants marked as high-quality by GATK (truth sensitivity level: 99.0), with a genotype quality ≥ 30 and, if known, a minor allele frequency (MAF) < 0.05 in dbSNP were selected for downstream analysis. Variants annotated with the “Modifier” impact level and those resulting in synonymous substitutions were skipped.

Sanger sequencing

The DNA used for sequencing was isolated from blood using the Nucleospin blood QuickPure kit (Machery-Nagel). Sanger sequencing of known FHL-genes and *CD48* was performed on a Microsynth system.

RNAseq

RNA was extracted either from freshly isolated PBMCs or after a 24-hour incubation with PHA (1 μ g/ml). Sequence alignment with the reference genome (build GRCh38) and quantification of expression was performed with RSEM (Version 1.2.21)¹⁴. GO-enrichment analysis was performed with EnrichR (amp.pharm.mssm.edu/Enrichr), using the lists of significantly differentially expressed genes in resting cells and in PHA-stimulated PBMCs. The R bioconductor package DEXSeq (v1.20.2) was used to check for alternative splicing events.

Quantitative PCR

RNA was isolated from HEK293 cells using TRIzol and then purified using the Pure Link RNA Mini Kit (Life Technologies), including on-column DNase treatment. Total RNA was reverse-transcribed with oligo-dT AMV Reverse Transcriptase (Roche). Gene expression was determined using quantitative real-time PCR with the FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix and System (Roche). *GAPDH* was used for normalization. Primer sequences used for CD48 quantification were as follows. Primer set 1-2, spanning exons 1 to 2: Forward: 5'TTC GTG TCT GGC TCT GGA AT3' and Reverse: 5'CCG GAG ACC ACG GTC ATA 3'; Primer set 2-3 spanning exons 2 to 3: Forward: 5'TGA TGA CAG GCT TGG GTA CA 3', Reverse: 5' CCT ACA TCA TGA GGG TGT TGA A 3'. Fluorescence during PCR and subsequent dissociation was measured in quadruplicate on a 7900ht Fast Real Time PCR System and analyzed using Applied Biosystems SDS2.4 software.

Flow cytometry

To measure the levels of CD48 expression on cell subsets, whole blood was incubated with an antibody mixture (anti-CD4-PE-Cy7, anti-CD8-APC-Cy7, anti-CD14-APC, anti-CD20-BV450, anti-CD45-PerCP, anti-CD48-FITC, and anti-CD56-PE, all from BD Biosciences). Erythrocytes were lysed (Pharm Lyse, BD Biosciences) and the cells washed twice (Stain Buffer, BD Biosciences). For T and NK cell phenotyping, cryopreserved PBMCs were pre-incubated with 10% human serum (to block Fc receptors) and then stained with anti-CD3-PE (BD Pharmingen), anti-CD56-APC (Molecular Probes), anti-CCR7-BV421 (BioLegend), anti-CD4-PECy7 (BD), anti-CD45RA-FITC (BD Pharmingen), anti-CD94-PECy7 (BioLegend), and anti-2B4-A700 (BioLegend). Fluorescence minus one (FMO) controls were included for each measurement. Data was acquired on a LSRII Fortessa system (Becton Dickinson). For HEK293 cell staining, cells were washed with PBS, detached from the plate (TrypLE Express, Life Technologies), stained for CD48 (anti-CD48-FITC, anti-CD48-PE, BioLegend) and measured on a Gallios (Beckman Coulter) flow cytometer. EBV-immortalized B cells were stained for CD48 (anti-CD48-FITC, BioLegend), and the data were acquired on a Gallios (Beckman Coulter) flow cytometer. All data were analyzed using FlowJo software (version 10.7, Tree Star).

T-cell proliferation

Proliferation of control and patient PBMCs was determined after purification (density gradient centrifugation) and cell culture for three days in the presence of mitogens (5 μ g/ml PHA or 2.5 ng/ml PMA+Ionomycin, Sigma Aldrich; 0.05 μ g/ml anti-CD3 antibody, Beckman Coulter) or for five days in the presence of antigens (25 PNU/ml *Candida* antigen (Greer Laboratories), approx. 1:1000 (batch-dependent) CMV (Virion/Serion GmbH); and 1.5 Lf/ml tetanus toxoid (NIBSC)). [3 H] thymidine was added for the last 18 hours. Cell proliferation was determined as counts per minute (cpm) of incorporated [3 H] thymidine.

NK-cell degranulation

PBMCs were co-cultured in the presence or absence of K562 target cells in complete IMDM medium at 37°C for 2 hours. PE-labeled anti-CD107a antibodies were added to the co-culture. The co-cultured cells were stained with anti-CD107a-PE, anti-CD3-PerCP and anti-CD56-APC (BD Biosciences). Data were acquired using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and data analyzed using FlowJo (version 10.7). A level of NK cell degranulation below 10% was considered to be abnormal. For CD48 blocking assays, PBMCs expanded with IL-2 were co-cultured with autologous EBV-immortalized B-LCLs previously incubated for 1h with 5 μ g/ml of blocking anti-CD48 antibody (BD Pharmingen) or mouse IgM isotype control (Biolegend). The co-cultured cells were stained with anti-CD107a-PE, anti-CD3-PerCP and anti-CD56-APC (BD Biosciences). Data were acquired using a LSR Fortessa flow cytometer (BD) and analyzed using FlowJo (version 10.7). For each experiment data was normalized to the maximum degranulation (mean of percentage of degranulating cells without antibody blocking on target cells) after subtracting the spontaneous degranulation (mean of NK cell degranulation without target cells).

Cell lines

HEK293 cells expressing wild-type (wt) CD48 or the mutant CD48-659A were produced using the Flp-In System (ThermoFisherScientific), according to the manufacturer's instructions. *CD48-wt* and *CD48-659A* DNA sequences were chemically synthesized and cloned into donor vectors (pDONR221, ThermoFisherScientific), and then sub-cloned into a destination vector (pcDNA 5/FRT/TO) using the LR Clonase II Enzyme Mix (ThermoFisherScientific). Flp-In 293 cells (ThermoFisher Scientific) were transfected with the destination vector and the recombinase-containing pOG44 plasmid (using Lipofectamine 2000) and selected by growth in DMEM medium supplemented with 200 μ g/ml hygromycin for 2 weeks.

NK cell-mediated cytotoxicity

HEK293 cells expressing either CD48-wt or CD48^{S220Yhet} and EBV-immortalized patient and healthy control lymphoblastoid cell lines (B-LCL) were stained with CellTrace-violet (Life Technologies). The HEK293 cells were then incubated with IL-2 activated (100 U/ml for 2 days) NK-92 cells for 24 hours at an effector/target ratio of 5:1 (600,000 cells per well in 96-well plates). The B-LCLs were incubated with IL-2-activated (100 U/ml for 24 h) primary autologous NK cells for 4 hours at the indicated effector:target ratio and in the presence of absence of rituximab (Roche, 20 μ g/ml, coated for 15 minutes). The number of viable cells was determined (by propidium iodide staining and flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter)) at the beginning of the incubation and after 4 or 24 hours. The percentage of killed (non-viable) cells was expressed given as the decrease in the cell count between the beginning and the end of the assay. HEK293 killing assays were performed in quadruplicate. B-LCL killing assays was performed in duplicate using two different primary NK cell donors.

NK cell induction

PBMCs from controls and the patient were cultured in medium in the presence or absence of IL-12 (10 ng/ml) for 18 hours. Cells were stained for NK cell surface and intracellular markers and analyzed using flow cytometry (LSRFortessa, BD Biosciences).

Cytokine assays

Serum levels of IFN γ , IL-6 and sCD25 were measured using commercially available ELISA kits, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Soluble CD48 (sCD48) in patient and control blood serum or plasma was assayed using a CD48 ELISA kit (Sino Biological), according to the manufacturer's instructions.

CD48 protein assays

Total cellular CD48 concentration was determined using an ELISA, as described for the cytokine assays. Total protein concentration was measured with a Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Division of the CD48 concentration by the concentration of total protein in the sample allowed us to determine the CD48 as a fraction of total protein.

CD48-deficient mouse model

C57BL/6J wildtype mice, C57BL/6J-Prf1tm1Sdz/J mice (herein after referred to as PKO) and C57BL/6J CD48^{-/-} mice were obtained from The Jackson Laboratory. Heterozygous C57BL/6J CD48^{+/-} mice were generated by crossing CD48^{-/-} and wildtype C57BL/6J, and then genotyped using PCRs. Viral preparations of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV, kindly provided by Peter Aichele (University of Freiburg, Germany)) were intraperitoneally injected into 6- to 8-week-old mice at the dose of 2500 plaque-forming units (pfu). PKO mice were used as positive controls, data for PKO mice is not shown. Mice were injected on day 0 and sacrificed and sampled on day 12. LCMV-infected animals were housed in a biosafety level 2 facility. Mice were maintained and handled in accordance with national and institutional policies.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 10, GraphPad Software). An unpaired *t*-test or ANOVA was used to compare datasets. The threshold for statistical significance was set to $p \leq 0.05^*$, $p \leq 0.01^{**}$, or $p \leq 0.001^{***}$.

References:

1. Henter JJ, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-131.
2. Ravelli A, Minoia F, Davi S, et al. 2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(3):481-489.
3. Ravelli A, Minoia F, Davi S, et al. 2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(3):481-489.
4. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):973-980.
5. Marsh RA, Satake N, Biroschak J, et al. STX11 mutations and clinical phenotypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in North America. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(1):134-140.
6. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 1997;40(10):1879-1885.
7. Yalçinkaya F, Ozen S, Ozçakar ZB, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(4):395-398.
8. Kuemmerle-Deschner JB, Ozen S, Tyrrell PN, et al. Diagnostic criteria for cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS). *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):942-947.
9. Vanoni F, Theodoropoulou K, Hofer M. PFAPA syndrome: a review on treatment and outcome. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2016;14(1):38.
10. Federici S, Sormani MP, Ozen S, et al. Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):799-805.
11. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-311.
12. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081.
13. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249.
14. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323.

Figure legends:

Supplemental Figure 1. Features of the patient's HLH-like episodes. (A) The number of HLH-like episodes suffered by the patient, by age. (B) Photographs of skin lesions during two HLH episodes, showing urticarial rash (arrow) and maculopapular rash. (C) Images of bone marrow smears taken during an HLH episode, showing ongoing hemophagocytosis.

Supplemental Figure 2. Degranulation and cytotoxicity. (A) The patient's PBMCs were analyzed by flow cytometry, gated for CD56+TCR- lymphocytes, and stained with isotype control (left) and anti-Perforin-PE (right) antibodies to assess intracellular perforin expression. (B) Degranulation of CD3⁺CD56⁺ NK cells, assessed by measuring CD107a expression after incubation with (red line) or without (blue area) NK-sensitive K562 target cells in PBMCs from a healthy control, a patient with FHL3, and the index patient. Degranulation of more than 10% is considered to be normal. Representative histograms from three independent analyses are shown. (C) Killing of Fas-deficient target cells by T lymphocytes in the presence of anti-CD3 antibody. The effector-to-target cell ratio (x axis) reflects the ratio of CD8⁺ T cells (PHA-blasts) to L1210-3 target cells. The results are expressed as the percentage of specific lysis (y axis), as measured by ⁵¹Cr release.

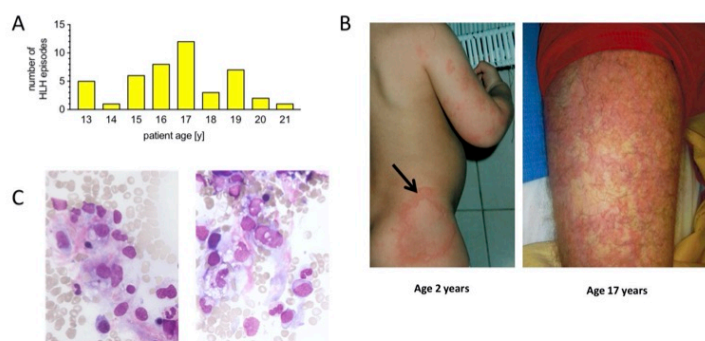
Supplemental Figure 3. CD48 reads. (A) The number of WES-reads for the two different CD48 alleles CD48-wt (reference) and CD48-659A (variant), from DNA isolated from the patient's blood cells. (B) The number of RNAseq-reads for the two different CD48 alleles CD48-wt (reference) and CD48-659A (variant) in the patient's PBMCs.

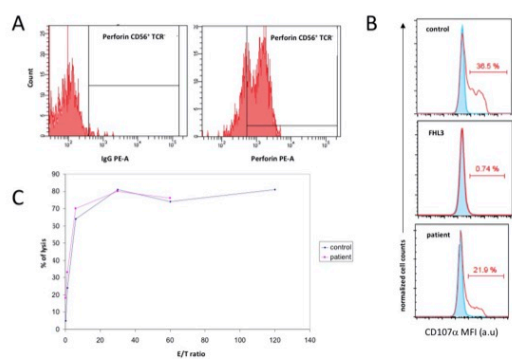
Supplemental Figure 4. Low levels of cell surface CD48. The mean fluorescence intensity (MFI) of cell surface and intracellular CD48 in monocytes and lymphocytes from the patient (red) and from two healthy controls (black), as quantified by imaging flow cytometry (>10000 events).

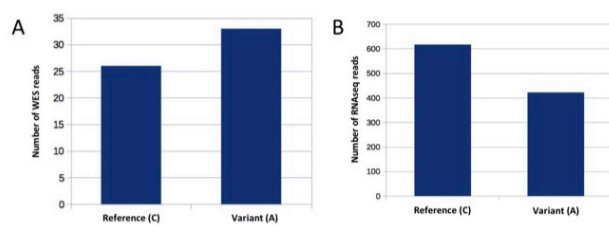
Supplemental Figure 5. **CD48^{S220Yhet} expression.** (A) Cell surface CD48 expression on non-transfected HEK293 cells (control, grey line) and on HEK293 cells transfected with either *CD48-wt* (black line) or *CD48^{S220Yhet}* (red line). Representative histograms of three independent experiments are shown. (B) CD48 protein in total protein lysates from *CD48-wt*- (black bar) or *CD48^{S220Yhet}*-transfected (red bar) HEK293 cells (an average of three measurements). (C) Relative mRNA expression levels of *CD48* mRNA in HEK293 cells transfected with either *CD48-wt* (black) or *CD48^{S220Yhet}* (red), normalized against values for *CD48-wt* transfectants.

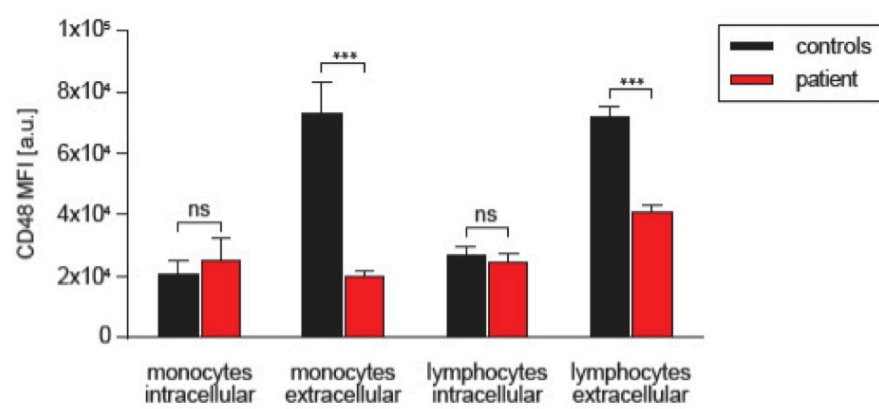
Supplemental Figure 6. **Flow cytometry gating strategy for NK lymphocyte phenotyping.** Singlet CD3⁻ CD56⁺ NK cells were divided into three subsets, according to the CD94 and CD56 expression: CD56^{bright} CD94^{high}, CD56^{dim} CD94^{high}, and CD56^{dim} CD94^{low}.

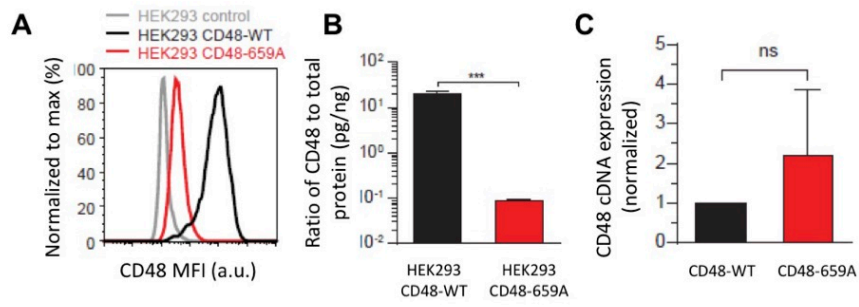
Supplemental Figure 7. **Transcriptomic analysis of components of the 2B4 signaling pathway** derived from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes collection in freshly isolated, unstimulated PBMCs from the patient vs. a healthy control. Genes upregulated in the patient's cells are indicated by a red arrow.

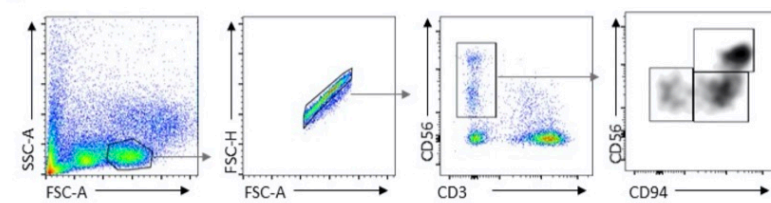


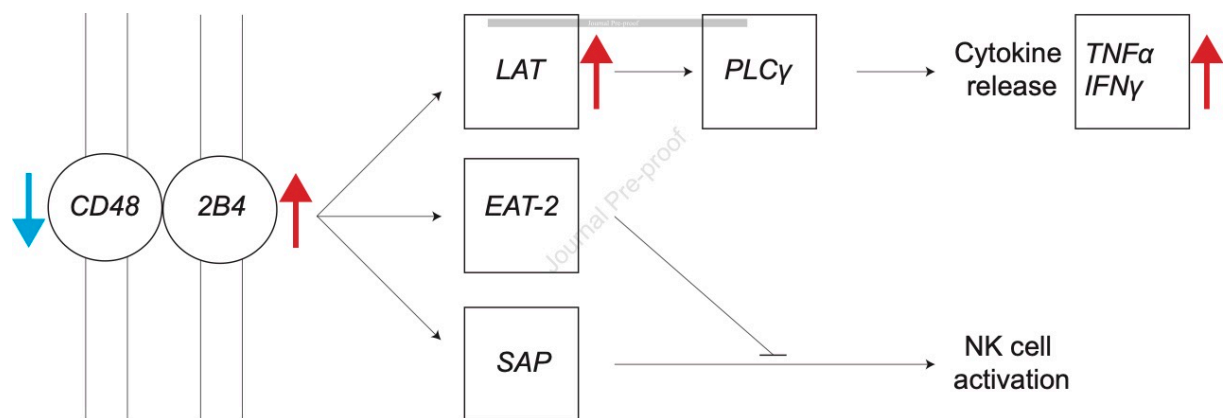












4. Lebenslauf

Name, Vornamen Gossweiler, Emanuel Benjamin

Geschlecht: Männlich

Geburtsdatum: 15.05.1993

Heimatort und Kanton Dübendorf ZH

Ausbildung:

2000 - 2006: Primarschule Langmatt Zürich

2006 - 2012: Realgymnasium Rämibühl Zürich,
Neusprachliches Profil mit Schwerpunktfach Englisch

2013 - 2014: Eidgenössische Technische Hochschule Zürich,
Pharmazeutische Wissenschaften

2014 - 2017: Universität Zürich, Bachelor of Medicine

2017 - 2020: Universität Zürich, Master of Medicine

5. Erklärung

Masterarbeit

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir im Rahmen des Studiengangs

Master of Medicine (M Med)

eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel

Recurrent inflammatory disease caused by a heterozygous mutation in CD48

um eine von mir selbst und ohne unerlaubte Beihilfe sowie *in eigenen Worten* verfasste Masterarbeit* handelt.

Ich bestätige überdies, dass die Arbeit als Ganzes oder in Teilen weder bereits einmal zur Abgeltung anderer Studienleistungen an der Universität Zürich oder an einer anderen Universität oder Ausbildungseinrichtung eingereicht worden ist.

Verwendung von Quellen

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich *sämtliche* in der oben genannten Arbeit enthaltenen Bezüge auf fremde Quellen (einschliesslich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich *ausnahmslos* und nach bestem Wissen sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen anderer Autorinnen oder Autoren (Paraphrasen) die Urheberschaft angegeben habe.

Sanktionen

Ich nehme zur Kenntnis, dass Arbeiten, welche die Grundsätze der Selbstständigkeitserklärung verletzen – insbesondere solche, die Zitate oder Paraphrasen ohne Herkunftsangaben enthalten –, als Plagiat betrachtet werden und die entsprechenden rechtlichen und disziplinarischen Konsequenzen nach sich ziehen können (gemäss §§ 7ff der Disziplinarordnung der Universität Zürich sowie §§ 51ff der Rahmenverordnung für das Studium in den Bachelor- und Master-Studiengängen an der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich).

Ich bestätige mit meiner Unterschrift die Richtigkeit dieser Angaben.

Datum:

Name: Gossweiler

Vorname: Emanuel

Unterschrift:.....

* Falls die Masterarbeit eine Publikation enthält, bei der ich Erst- oder Koautor/-in bin, wird meine eigene Arbeitsleistung im Begleittext detailliert und strukturiert beschrieben.